动 物 学 研 究 1992, 13(4):299—304
Zoological Research
ISSN 0254—5853
CN 53—1040/Q

蟾蜍胰腺内分泌细胞的形态学和体视学研究

敖竹君 王庆堂* 包含飞**
（遵义医学院组织胚胎教研室 563003）

摘要 本实验应用免疫组织化学 PAP 法和免疫金银法 -PAP 法免疫双重标记以及常规电镜，对蟾蜍胰岛A、B、D 细胞的形态结构及分布进行了观察；并利用A蛋白胶体金（PAG）免疫电镜技术，对胰岛素进行细胞内精确的定位。同时，根据体视学有关立体重建的原理，从A、B 细胞不同大小的切面的频数分布，重建了其球体大小的频数分布

关键词：免疫组织化学，A蛋白胶体金免疫电镜（PAG），胰岛A、B、D细胞，立体重建

大多数脊椎动物的胰腺内分泌细胞至少包括A、B、D三种类型，其分布因动物种类的不同而不同。近年来，随着免疫组织化学的发展和应用，国外学者已证实无尾两栖类如牛蛙的A、B、D细胞分别含有胰高血糖素、胰岛素和生长抑素（Kaung, 1980；Tomita, 1981）。而有关蟾蜍胰岛内分泌细胞的类型、分布、形态及超微结构的详细而完整的研究尚未见报道。

体视学源自定量地矿学，已有较长的历史。随着生物医学科学的定量化趋势，这一领域已渐成热潮。Wicksell（1921）、Cruz-orive（1970, 1978）及其他学者曾研究过从切片的资料估计立体状况的问题，Weibel(1979) 则对此过程作了详细描述。Wicksell等将上述方法运用于大鼠胰岛的大小分布的研究。

本实验应用免疫组织化学方法，普通电镜及免疫电镜对蟾蜍胰岛细胞的形态结构及细胞构筑等进行了初步研究，并将 Weibel 提供的步骤程序化，从测得的 A、B 细胞不同大小的切面的频数分布重建其实际的立体分布。

材 料 与 方 法

一、动物及取材 成体蟾蜍 8 只，雌雄不分。剖腹取胰尾，一部分用改良Bouin液固定，石蜡包埋，5μ 连续切片。另一部分用戊二醛前固定，锇酸后固定，EPON-812 包埋，Ao-Ⅱ超薄切片机切片。日本产H-300型透射电镜观察。

二、试剂 豚鼠抗胰岛素抗血清（Anti-INS）系 INC 公司产；兔抗胰高糖素抗血清（Anti-GLU）系 PLC 公司产，兔抗生长抑素抗血清（Anti-SOM）系 sigma 公司

---

* 同济医科大学组织胚胎教研室 430030
** 上海中医学院组织胚胎教研室 200032

本文1991年 3 月 4 日收到，同年12月28日修回。

产；羊抗兔IgG系中国医科院基础医学研究所免疫室提供；过氧化物酶-兔抗过氧化物酶复合物（PAP）由同济医科大学附属同济医院提供。金标PA为本组制备。

三、免疫组织化学方法 1. PAP法：系Sternberger（1979）法。第一抗体分别为Anti-INS、Anti-GIU和Anti-SOM。2. 免疫金银法（IGSS）-PAP法免疫双重标记：Holgate的IGSS法。在同一张切片上先以Anti-INS为第一抗体行IGSS标记B细胞，然后用Anti-GLU或Anti-SOM进行PAP法标记A或D细胞。

四、PAG免疫电镜技术 1. 载有超薄片的镍网浮于1％过碘酸液4分钟，1％过碘酸钠6分钟；2. TBS冲洗；3. 4％卵清蛋白液20分钟；4. 豚鼠抗胰岛素抗血清（1:1000），室温2小时，4℃24小时；5. TBS洗；6. 4％卵清蛋白，5分钟；7. 金标PA1:10（10nm），室温下1小时；8. TBS冲洗，四蒸水洗；9. 电子染色。

五、对照实验 用正常豚鼠血清或兔血清代替一抗，或用缓冲液代替金标PA复合物，或用生长抑素加入抗生长抑素抗血清中代替一抗。

六、立体重建过程 采用固定式目镜长度和网格测微计，10×100放大。所测A、B细胞的卡规直径按15个大小等级，级差2μm计算其数-面密度NA（i），包容空间为内分泌部，并将算法程序化。其基本公式为（Weibel，1979）：

$$N_{v(j)} = \frac{1}{\Delta}\left[\sum_{i=j}^{m} \alpha_{ij} N_{A(i)}\right]$$

式中$N_A(i)$为数-面密度（可测值），αij为系数矩阵，Δ为级差，$N_{v(j)}$为第j级大小的细胞的数-体密度。运算在微机上进行。

结 果

一、光镜 蟾蜍胰岛细胞单个地或几个乃至数十个一组地分散在胰腺的外分泌组织中。切面上少于10个细胞的胰岛占51.25％（表1）。胰岛外围极少量的结缔组织，内外分泌组织分界不明显。利用免疫组织化学染色发现B细胞呈高柱状，排列成带样，位于胰岛的中央（图版Ⅰ：1）。A细胞为圆形或梭形，位于B细胞的周围或聚集于B细胞的一侧。D细胞多为梭形，常伸出细长的突起。D细胞常位于A细胞之间（图版Ⅰ：2）较大的胰岛有A、B、D三种细胞，但许多胰岛却只有A、D细胞或仅有A细胞。此外，常见单个内分泌细胞位于外分泌组织中。

二、电镜 胰腺腺泡细胞有非常丰富的粗面内质网，呈环行层状排列，靠近腺泡腔的胞质内充满高密度的大圆形的酶原颗粒（图版Ⅰ：3）。内分泌细胞的粗面内质网明显不如腺泡细胞的发达，其它细胞器也较稀少，内分泌颗粒为较酶原颗粒小而密度不等的膜包颗粒。胰岛外包绕少量胶原纤维，偶可见内外分泌细胞直接接触（图版Ⅰ：4）。胰岛内有丰富的毛细血管。有时可见单个内分泌细胞位于腺泡细胞之间或嵌于导管上皮内（图版Ⅰ：5）。

B细胞的分泌颗粒较大，为圆或椭圆形的膜包颗粒。根据其芯的形态可分为两类：一类芯为圆形，密度较高，晕较窄；另一类颗粒较丰富，芯由致密物质排列成花瓣样，晕宽变化大。PAG免疫电镜显示，B细胞的颗粒上特异性地附着金粒，且主要位于芯

上（图版Ⅰ：7）

A细胞有非常丰富的高电子密度的分泌颗粒。颗粒较B细胞的小，圆形，晕窄。常有单个A细胞位于外分泌组织中或小导管上，形态不规则，可伸出许多突起（图版Ⅰ：5、6）

D细胞分泌颗粒密度不等，一般为低至中等密度，膜与芯紧贴，有的颗粒轮廓不清。该细胞常伸出长突起。

此外，在靠近胰岛的腺泡细胞之间或胰岛周边，可发现一种胞浆内同时含有内外分泌颗粒的细胞。用PAG免疫电镜法证实这种细胞的β样颗粒上特异性地附着有金粒（图版Ⅰ：6）。

三、立体重建　图1a和b为蟾蜍胰岛A、B细胞的各级细胞截面的数-面密度分布直方图，图2a和b则分别表示经立体重建后的各级细胞球体的数-体密度分布直方图。表2为运算所得的A、B细胞的球体大小的立体分布重建结果。

表1　蟾蜍胰腺不同大小胰岛的百分率

Tab. 1　The percentage of pancreatic islets in different size for toad

细胞数（个）	<10	10—20	>20
百分率（%）	51.25	27.5	21.25

表2　蟾蜍胰岛不同等级大小 A、B细胞的数-体密度〔Nv(j)〕

Tab. 2　The number-volume densities for the size-classes〔Nv(j)〕of A and B cells in pancreatic islets from toad (number/mm³)

细胞 \ 组别	X 1	X 2	X 3	X 4	X 5	X 6
A	1.043	351.157	0.000	56627.117	90879.265	61880.483
B	211.349	1411.201	0.000	101171.574	198439.188	141683.483

细胞 \ 组别	X 7	X 8	X 9	X 10	X 11—15
A	62169.605	22219.327	4699.591	9449.705	0.000
B	79904.030	18156.437	12123.376	16355.194	0.000

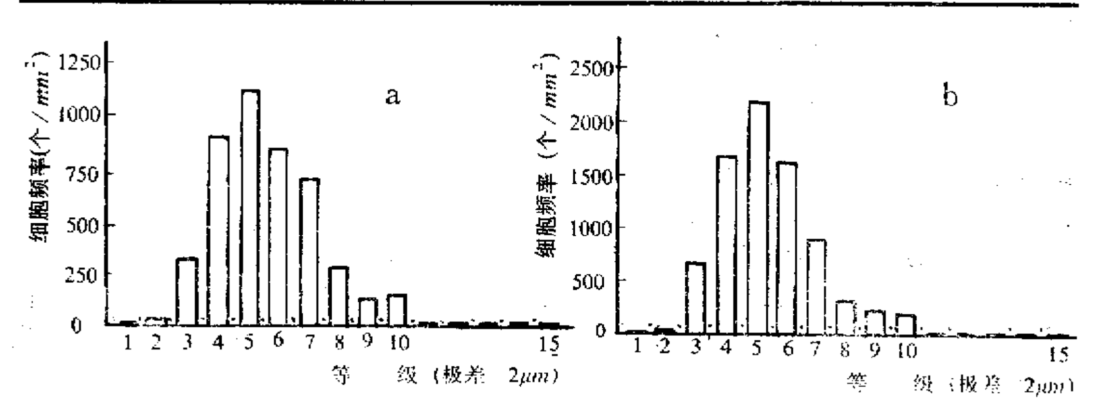


图1　蟾蜍胰岛A、B细胞的各级细胞截面的数-面密度分布直方图
a：A细胞　b：B细胞

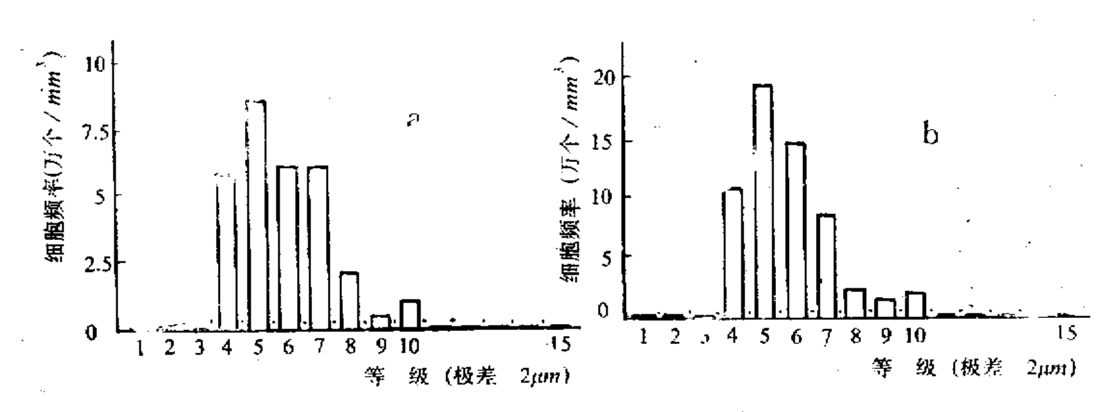


图2　蟾蜍胰岛A、B细胞的各级细胞球体的数-体密度分布直方图
a：A细胞　　b：B细胞

讨　论

大多数脊椎动物的胰腺内分泌组织呈岛状分散于外分泌组织中，且均有A、B、D三种细胞。但胰岛的分布、细胞类型及分布、细胞比例等却存在种属差异。两栖类动物蟾蜍的胰岛具有显著的特点。

有的硬骨鱼类，内分泌细胞集中在一个或多个主要胰岛或集中于Brockmann小体。而大多数硬骨鱼类的胰腺内分泌细胞聚集成很大的胰岛，分散在腺泡组织间，外围很厚的结缔组织。但两栖类的内分泌细胞却是零散地分布，以单个细胞或几个细胞的分布方式为主，同时其外围的结缔组织减少甚至消失，内外分泌部得以充分密切地接触。继续向爬行类、鸟类进化，内分泌组织则逐渐集中，最后发展成哺乳类和人的分散在外分泌组织中的典型胰岛。

哺乳类动物胰岛细胞类型的分布暗示着分泌不同激素的细胞构成了一个内在的有机体，它的外层是以A细胞为主，夹杂着D细胞和少量B细胞的异种细胞区，中央则是B细胞组成的同种细胞区。这些细胞之间相互影响，相互控制，使整个胰岛成为一个功能性结合体。但对于较低等的脊椎动物两栖类，尽管它的一些胰岛细胞的分布已类似于哺乳类，但还有大量的胰岛只有A、D细胞或A细胞。蟾蜍D细胞分布广泛，分布在B细胞周围或A细胞之间，常常有细长的突起。D细胞可通过旁分泌作用直接控制邻近的A、B细胞的活动。在较低等的脊椎动物，D细胞的调节作用尤为重要。在硬骨鱼类，D细胞的数量高于A细胞（Johnson，1976；Wagner，1981），据推测生长抑素是硬骨鱼类的胰岛激素释放的原始调节因素。当进化到两栖类时，D细胞的调节功能仍占有重要地位。

在硬骨鱼类、两栖类、鸟类、哺乳类（Rombout，1979；Prieto-Diaz，1967；Bjorkman，1964；Leduce，1968）曾观察到既含有大的外分泌酶原颗粒，又含小的内分泌颗粒的间介细胞（Intermediate cell）。本实验用PAG免疫电镜证实这种细胞的β样颗粒的确含有胰岛素成分。这种细胞可能代表一种原始状态的干细胞，这些干细胞还没有精确地分化为外分泌细胞和内分泌细胞。

本文利用立体计量术把切片的二维可测性定量结果转化为三维定量结果，使这些信息更接近于细胞和组织的生命本质，赋细胞结构和功能关系的研究以实际意义。

图 版 说 明

1. PAP法显示B细胞　×600
2. 免疫金银法-PAP法双重标记B细胞（⊗及斜线表示）和D细胞　×600
3. 毛细血管及其周围的腺泡细胞（上方）和内分泌细胞（下方）　×200
4. 单个A细胞（中央）与腺泡细胞（左下方）直接接触，右上方为结缔组织　×600
5. 上皮细胞间有一内分泌细胞（左）的小导管　×2500
6. PAG法示间介细胞内抗胰岛素血清阳性的颗粒　×30000
7. PAG法示B细胞内抗胰岛素血清阳性的颗粒　×30000

参 考 文 献

〔美〕PT.本特利著. 方永强等译. 1984. 脊椎动物比较内分泌学. 北京：科学出版社，38—43.

蔡文琴. 1988. 实用免疫细胞化学，成都，四川科学技术出版社，91—180.

Cruz-Orive, L.M. 1976. particle size-shape distributions, the general spheroid problem. I. Mathematical model. *J. Microsc.* 107:235.

Cruz-orive, L. M. 1978. Partical size-shape distributions, the general spheroid problem. I. Stochastic model and practical. *J Microsc.* 112:153.

Johnson, D.E. *et al.* 1976. Immunohistochemical localization of somatostatin, insulin and glucagon in the principal islets of the Anglerfish (Lophius americans) and the Channel Catfish (Ictalurus punctata): (1) (2). *Am J Anat.* 147:119.

Kaung, H.L.C. *et al.* 1980. Distribution and morphometric quantitation of pancreatic endocrine cell type in the frog, Rana pipiens. *Anat Rec.* 196:173.

Kobayashi, K. 1966. Electron microscopic studies of the langerhans islets in the toad pancreas. *Arch. Histol Japen.* 26:439.

Leduc *et al.* 1968. Acinar-Islet cell transformation in mouse pancreas. *J Ultrastruct Res.* 24:165.

Prieto-Dias H. *et al.* 1967. Acino-insular relationship in the pancreas of the toad investigated with the electron microscope. *Acta anat.* 67:291.

Rombout, J.H.W.M. *et al.* 1979. Pancreatic endocrine cells of Barbus conchonius (Teleostei, Cyprinidae), and their relation to the enter-oendocrine cells. *Cell Tissue Res.* 203:9.

Tomita, T. *et al.* 1981. Four pancreatic cells in the Bullfrog(Rana Catesbeiana). *Gen* and *Comp. Endocrinology* 45:355.

Wagner, G.F. *et al.* 1981. Immunocytochemical localization of hormone producing cells within the pancreatic islets of the rainbow trout (Salmo Gairdneri). *Cell Tissus Res.* 221:181.

Weibel, E.R. 1979. Stereological methods, Vol. I. Practical methods for biological morphometry, Academic Press Inc. London. pp. 189

MORPHOLOGICAL AND STEREOLOGICAL STUDIES OF THE LANGERHANS ISLET CELLS IN THE TOAD PANCREAS

Ao Zhujun Wang Qingtang Bao Hanfei

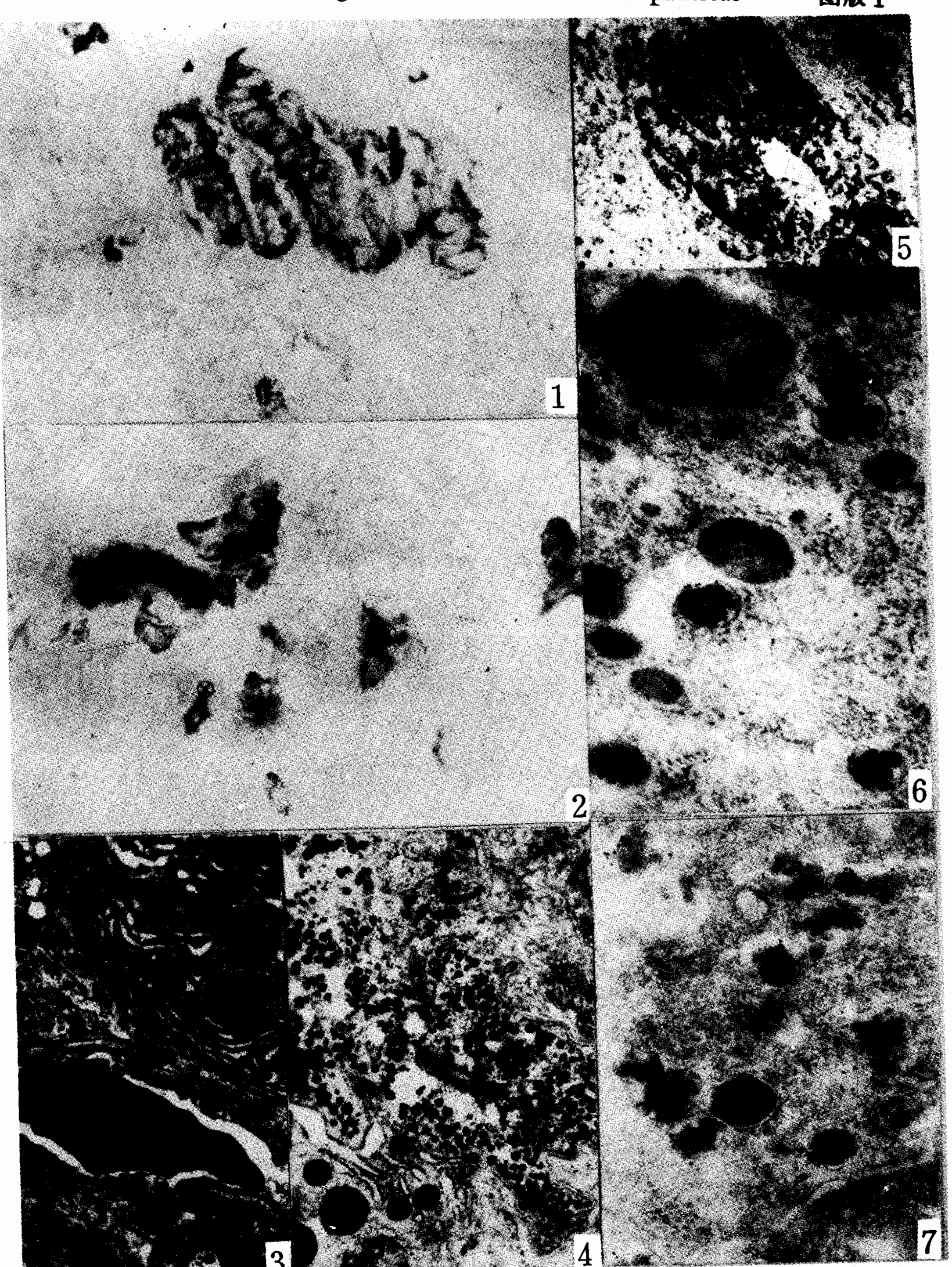
(*Zunyi Medical College,* 563003)

The distribution and morphology of the A, B and D cells in toad pancreas were observed with immunohischemistry (PAP method, PAP—protein A gold-silver double staining) and electron microscopy. By PA-gold (PAG) method, the precise intracellular localization of insulin has been observed. The stereological algorithms for the conversion of the profile-size frequency distribution observed in histological section to the sphere-size frequency distribution in three-dimension space have been developed to a computer program and were applied to A, B cells in the pancreas.

Key words: Immunohistochemistry, PA-gold method, The A, B, D cells of islet, Stereological reconstruction

---

图版 I



（图版说明在正文内）